

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
SÄURESTABILER PROTEASENINHIBITOREN
AUS DEM INTESTINALTRAKT VON
MENSCH UND HUND**

Georg Bickel

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem biochemischen Laboratorium
der HNO-Universitätsklinik München
Direktor : Professor Dr.med. H.H.Naumann

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG SÄURESTABILER
PROTEASENINHIBITOREN AUS DEM INTESTINALTRAKT
VON MENSCH UND HUND

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Georg Bickel
aus
München

München 1976

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof.Dr. K.Hochstrasser
Mitberichterstatter : Prof.Dr. H.H.Naumann

Dekan : Prof.Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 6.7.1976



Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung:	
Entdeckung und Geschichte der Proteasen- inhibitoren	1
II. Theoretischer Teil	2
Definition des Begriffs Protease und Pro- teaseninhibitor	2
Reaktionsmechanismus der Proteolyse und Wech- selwirkung von Proteasen und Proteaseninhibi- toren	5
Physiologische Bedeutung von Proteaseninhibi- toren	7
Pharmakologie der Proteaseninhibitoren	15
III. Experimenteller Teil	17
Ergebnisse	
Inhibitorgehalt bezogen auf Frischgewicht	17
Hemmspektrum der verschiedenen Inhibitor- konzentrate des Hundes	18
Hemmspektrum und Hemmkurven des Inhibitors aus menschlichem Colon	20
Bestimmung des Molekulargewichts des Inhibi- tors aus menschlichem Colon	24
IV. Methoden	28
V. Diskussion	37
Zusammenfassung	39
Literaturverzeichnis	40

I. Einleitung

Entdeckung und Geschichte der Proteaseninhibitoren.

1903 wurde von Weinland (1) die Widerstandsfähigkeit von Nematoden im Verdauungstrakt gegenüber menschlichen Verdauungsfermenten beobachtet und er erklärte dies mit dem Vorhandensein von "Antienzymen".

Frey, Kraut, Werle (2) entdeckten 1930 einen Hemmstoff für Kallikrein in Parotis, Milz und Lymphknoten des Rindes.

1936 isolierten Kunitz und Northrop (3) einen identischen Inhibitor aus Rinderpankreas. Dieser Inhibitor ist unspezifisch, er hemmt Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein. Ausser bei Rindern wurde er in geringerer Konzentration bei Ziegen und Schafen nachgewiesen.

Kazal (4) fand 1948 ebenfalls im Rinderpankreas einen spezifischen Inhibitor nur für Trypsin, der sich in seinem Hemmverhalten und seinem Molekulargewicht deutlich von dem von Frey, Kraut und Werle beschriebenen Inhibitor unterscheidet. Untersuchungen von Fritz, Trautschold und Werle (5) haben ergeben, dass im Pankreas aller Spezies "spezifische" Proteasenhemmstoffe vorkommen.

1944 wurde zum erstenmal von Ham und Sandstedt (6) ein Inhibitor in Pflanzen nachgewiesen. Weitere Untersuchungen über

diesen Inhibitor erfolgten durch Kunitz, Weitere pflanzliche Inhibitoren wurden isoliert aus Kartoffeln, aus Getreide und aus Rüben (7.8.9). Weitere tierische Inhibitoren wurden gefunden in *Ascaris lumbricoides suum* (10.11.12.13.14.15), im Ovomucoid (16), in der Colostrummilch von Mensch, Rind und Schwein (17.18.19). Ferner wurden im Serum von Rind (10.20.21.22), im Humanplasma (23), im Sperma aller Säugetiere (30.31), im Trachealsekret von Schwein und Rind (24), im menschlichen Nasensekret (25), im menschlichen Bronchialsekret (26) Proteaseninhibitoren gefunden.

Das vielfältige Vorkommen von Proteaseninhibitoren, besonders auf den Schleimhäuten des Respirationstraktes legte nun die Vermutung nahe, dass auch auf den Schleimhäuten des Intestinaltraktes Proteaseninhibitoren vorkommen. In der vorliegenden Arbeit war es nun die Aufgabe, die verschiedenen Darmabschnitte von Hund und Mensch auf ihren Inhibitorgehalt zu untersuchen und die Inhibitoren zu isolieren und zu charakterisieren.

II. Theoretischer Teil

Definition des Begriffs Protease und des Begriffs Proteaseninhibitor.

Proteasen und ihre Inhibitoren kommen in vielen tierischen und pflanzlichen Geweben, in Drüsen und im Blut vor. Chemisch gesehen handelt es sich dabei um hochmolekulare Eiweisskörper oder um relativ niedermolekulare Polypeptide, die gegenüber anderen Proteinen in ihrer Aminosäurezusammensetzung oder in anderen Eigenschaften keine Besonderheiten zeigen. Proteasen werden charakterisiert durch ihre Fähigkeit, Peptidbindungen zu spalten, Proteaseninhibitoren dadurch, dass sie diese Wirkung hemmen können. Eine Einteilung der Proteasen kann getroffen werden nach der von ihnen katalysierten Reaktion und nach ihrem aktiven Zentrum. Es gibt Endo- und Exopeptidasen. Endopeptidasen greifen an einer bestimmten Stelle in einer Peptidkette an. Zu diesen, die vorwiegend auf Proteine und höhere Polypeptide wirken, gehören Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Kallikrein sowie die Kathepsine der Gewebe und der weissen Blutkörperchen. Exopeptidasen spalten Aminosäuren vom Ende einer Peptidkette ab, die Carboxypeptidasen vom Carboxylende,

die Aminopeptidasen vom Aminoende. Nimmt man die Natur des aktiven Zentrums als Kriterium einer Klassifizierung, so lassen sich die Proteasen in 4 Gruppen einteilen. Pepsin bildet dabei eine eigene Gruppe, da es allein eine Carboxylgruppe im aktiven Zentrum enthält. Die zweite Gruppe benötigt zu ihrer Aktivität zweiwertige Metallionen. Hierher gehören vor allem die Exopeptidasen. Die dritte Gruppe bilden die SH-Enzyme, die durch SH-Reagenzien gehemmt werden. Die Serinenzyme sind in der 4. Gruppe zusammengefasst, sie enthalten Serin im aktiven Zentrum. Dazu zählen z.B. neben Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Elastase die hochspezifischen und für Regulationsmechanismen wichtigen Proteasen Kallikrein (32) und Thrombin (33). Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen sind die Proteasen nicht auf bestimmte Substrate eingestellt. Aber bedingt durch die Reaktionsbeteiligung der spezifisch strukturierten Umgebung der aktiven Zentren und ihre dreidimensionale Anordnung, besitzen sie insofern Substratspezifität, als sie an einer Peptidkette immer nur bestimmte Stellen angreifen, die durch die Art der Aminosäurereste charakterisiert werden.

Die Proteaseninhibitoren zeigen hinsichtlich ihrer Spezifität ein recht unterschiedliches Verhalten. Es sind Inhibitoren bekannt, die bei einem breiten Spektrum von Proteasen wirksam sind, und spezielle, die nur spezifische Proteasen hemmen. Dadurch wird eine gewisse Einteilung möglich. So lässt sich z.B. die Gruppe der Trypsininhibitoren festlegen, Inhibitoren, die vor allem Trypsin hemmen. Auch lassen sich diese Inhibitoren nach dem aktiven Zentrum klassifizieren. Das hat zu einer weiteren Unterteilung in zwei Gruppen geführt. Diese Hemmstoffe enthalten in ihren aktiven (oder reaktiven) Zentren definierte Lysin- oder Argininreste, die für ihre Funktion essentiell sind. Man spricht von Lysin- und Arginininhibitoren. Die Zugehörigkeit kann leicht entschieden werden : Lysininhibitoren werden durch Acylierung der e-Aminogruppen der Lysinreste inaktiviert, während Arginininhibitoren ihre volle Aktivität beibehalten (34).

Reaktionsmechanismus der Proteolyse und Wechselwirkung von Proteasen und Proteasen- inhibitoren.

Die Endopeptidasen des Magen- Darmtraktes werden, wie man seit längerer Zeit weiss (35.36.37.38), in Form inaktiver

Enzymvorstufen, sogenannter Zymogene gebildet. Erst durch das Enzym Enterokinase wird Trypsinogen zu Trypsin und durch Trypsin Chymotrypsinogen zum aktiven Chymotrypsin umgewandelt. Bei diesen Umwandlungsreaktionen treten nun nachgewiesenermaßen Konformationsänderungen ein, die im Falle der Serinenzyme dazu führen, dass zwei Aminosäurereste, nämlich Serin und Histidin in enge Nachbarschaft gelangen. Mit Hilfe spezieller Blockierungsreaktionen (29) lässt sich zeigen, dass diese beiden Aminosäurereste am katalytischen Vorgang der Proteolyse maßgeblich beteiligt sind. Diesem Befund zufolge kann man den Wirkungsmechanismus der Proteasen in Form einer Zweistufenreaktion erklären: unter Beteiligung des Histidinrestes als Protonendonator- bzw. -acceptor wird zunächst zwischen dem Serin der Protease und der Carboxylgruppe der angegriffenen Peptidbindung eine Esterbindung gebildet. Diese wird dann in zweiter Stufe hydrolysiert unter Freisetzung der Spaltprodukte und Regenerierung des Enzyms in die ursprüngliche Form. Die Kenntnis der Vorgänge, die sich bei der Proteolyse abspielen und einige weitere Befunde, die sich bei Untersuchungen über die Aminosäuresequenz im aktiven Zentrum von Trypsininhibitoren und über die Inaktivierbarkeit dieser Zentren ergaben, er-

lauben nun auch eine Erklärung über das Zustandekommen der Hemmwirkung natürlicher Trypsininhibitoren. Die nämlich gehen mit den Proteasen Komplexverbindungen ein, wobei die ersten Schritte einer Proteolyse durchlaufen werden, ohne dass dann jedoch aus dieser Reaktion das Trypsin und die Reaktionsprodukte frei werden. Auf Grund der Raumstruktur der Inhibitoren wird die Proteolyse auf einer bestimmten Stufe der Reaktionsfolge unterbrochen, bezw. limitiert. Die Hemmwirkung kommt also durch eine limitierte Proteolyse des Inhibitors zustande.

Physiologische Bedeutung der Proteaseninhibitoren.

Pflanzliche Inhibitoren steuern die pflanzeneigenen proteolytischen Enzymsysteme. Ferner vermutet man bei den in Symbiose mit Knöllchenbakterien lebenden Leguminosen in den Inhibitoren eine Schutzeinrichtung gegen ein Überhandnehmen der Bakterien und der von ihnen produzierten proteolytischen Aktivität. So deutet man auch die Funktion der Proteaseninhibitoren der Graminen, die mit Aerobakter in Symbiose leben.

Tierische Inhibitoren.

Die bei *Ascaris lumbricioides* suum gefundene inhibitorische Aktivität hemmt tierische Proteasen wie Trypsin und Pepsin, nicht aber pflanzliche, wie Papain (32). Hier liegt vermutlich die Bedeutung als Schutz gegen Verdauung durch den Wirtsorganismus.

Der im Colostrum enthaltene Inhibitor hemmt Pepsin. So werden die im Colostrum enthaltenen maternalen Immunkörper vor dem peptischen Abbau geschützt und können im Dünndarm zu einem grossen Teil resorbiert werden.

Der im Sperma, in Samenblasen, in Hoden, im Ovar vorkommende Inhibitor stellt wohl einen Schutzmechanismus gegen die lysosomalen Enzyme des Akrosoms dar und bewahrt intakte Samenzellen, befruchtete Eizellen und die Schleimhäute des Genitaltrakts vor Lysis. Die Inhibitorkonzentration hier ist testosteronabhängig.

Bedeutung von Proteaseninhibitoren bei der Pathogenese bronchopulmonaler Erkrankungen.

Laurell entdeckte, dass beim Menschen homozygot oder heterozygot vererbte Gendefekte vorkommen, die zu einem fast vollständigen oder teilweisen Ausfall des α_1 -Antitrypsin

produzierenden Systems führen. Dabei wurde erkannt, dass die homozygoten Merkmalsträger praktisch immer an einem abstruktiven Lungenemphysem und häufig zusätzlich an Bronchiektasen erkranken. Das heisst, dass in den Lungenalveolen und Bronchien dieser Patienten Prozesse ablaufen müssen, die offensichtlich nur durch den Mangel an α_1 -Antitrypsin möglich werden können. Da α_1 -Antitrypsin in seiner Funktion ein Proteaseninhibitor ist, ist anzunehmen, dass die Prozesse, die bei Mangel an α_1 -Antitrypsin ablaufen, proteolytischer Natur sein müssen. Weitere Beobachtungen bestätigen diese Hypothese. Proteasen aus Leukozyten oder Makrophagen können Lungengewebe andauen. In den Leukozyten kommt Elastase vor, die infolge ihrer Spezifität die Dehnbarkeit der Lungenalveolen verändert. α_1 -Antitrypsin vermag diese enzymatischen Aktivitäten zu hemmen, ferner Subtilisin eine Bakterienprotease und Pronase eine Pilzprotease. Das Sputum von α_1 -Antitrypsin-Mangelpatient mit Lungenemphysem oder Sputum bei bronchialen Affektionen enthält proteolytische Aktivität, die durch α_1 -Antitrypsin hemmbar ist. Kallikrein als kininliberierende Protease wirkt stark bronchokonstriktorisch. Die Empfindlichkeit der konstriktorischen Rezeptoren der Bronchien wird durch Applikation von Proteasen gesteigert. Die Verabreichung pflanzlicher Proteasen, die durch

Seruminhibitoren nicht gehemmt werden können, führen experimentell beim Tier zu Lungenemphysem und Bronchiektasien. Bei Arbeitern der Detergenzienindustrie, die proteasehaltigen Staub inhalieren, werden bronchopulmonale Affektionen beobachtet. Diese Beobachtungen erklären die Funktion des α_1 -Antitrypsins als Schutzmechanismus gegen überschüssende körpereigene proteolytische Aktivität bei Entzündungen und die Aktivität von Bakterienproteasen und Pilzproteasen bei Infektionen.

Inhibitoren gegen Proteasen im Verdauungstrakt.

Die Proteasen des Verdauungstrakts zerlegen das Fremdeiweiss der Nahrung in seine Bausteine und führen diese dem Stoffwechsel zu. An diesen Reaktionen beteiligtsind vor allem das Pepsin, das eiweisspaltende Enzym des Magens, sowie das Trypsin und das Chymotrypsin, die beide vom Pankreas sezerniert werden. Nun wird aber durch diese Verbindungen nicht nur der Abbau von Nahrungseiweiss in die Wege geleitet, es besteht vielmehr auch die Gefahr, dass körpereigenes Eiweiss verdaut wird, da die Substratspezifität der Spaltenzyme ja nicht auf ein bestimmtes Eiweiss, sondern auf Bindungstypen ausgerichtet ist, die gleichermassen Be-

standteil der körperfremden wie der körpereigenen Proteine sind. Diese Gefahr abzuwenden wäre nun Aufgabe eines Inhibitors. Tatsächlich hat sich herausgestellt, dass das Pankreas verschiedener Spezies einen Trypsininhibitor enthält, der synchron mit Trypsinogen sezerniert wird. Es wird angenommen, dass der Inhibitor die katalytische Aktivierung von Trypsinogen und damit weiterer Pankreasenzyme im Paenchym und Gangsystem verhindern soll, die durch geringe Mengen an aktiven Trypsin ausgelöst werden kann. Das Pankreas ist auf diese Weise in gewissem Masse vor Autolyse geschützt (39.40). Erst bei massiver Enzymaktivierung vermag der physiologische Inhibitorpool das aktivierte Trypsin nicht mehr abzufangen.

Funktion von Proteaseninhibitoren

bei der Entzündung.

Eiweissverdauung ist nicht nur ein Charakteristikum des Magen-Darm-Traktes. Sie ist überall dort anzutreffen, wo körpereigenes Zellmaterial zugrunde gegangen ist oder fremdes Zellmaterial in den Körper eingedrungen ist, unter Verhältnissen also, wie man sie z.B. bei Verwundungen findet. Jede traumatische Schädigung im Gewebe führt einerseits zu einer Aktivierung der Phagozyten, d.h. von Zellen,

die funktionslos gewordene Zellbestandteile in sich aufnehmen und mit Hilfe von katheptischen Enzymen, die in den Lysosomen dieser Phagozyten lokalisiert sind, intrazellulär verdauen. Daneben kommt es aber durch die Freisetzung von Gewebsproteasen sowie von proteolytischen Enzymen extravasal zerfallender Leukozyten zu einer Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems, das den Schock oder die Entzündungssymptomatik (41) - dolor, calor, rubor, tumor - verstärkt. Die Aktivierung der Kallikreine erfolgt dabei durch limitierte Proteolyse im Sinne der Aktivierung der Pankreasproteasen. Die Kallikreine selbst sind hochspezifische Proteasen, die ihrerseits die Kininfreisetzung durch begrenzte Proteolyse katalysieren. Unter diesem Aspekt ist es verständlich, dass endogene Proteaseninhibitoren oder exogene Hemmstoffe das Entzündungsgeschehen beeinflussen können.

Proteaseninhibitoren im Gerinnungssystem.

Entzündungsgeschehen bzw. Verwundungen stehen in enger Beziehung zu Fibrinolyse und Blutgerinnung, wobei Proteaseninhibitoren und Proteasen eine bedeutende Rolle spielen

len. Im Verlauf des Gerinnungsgeschehens werden bestimmte inaktive Faktoren durch bestimmte aktive Faktoren aktiviert. So werden als Folge einer limitierten Proteolyse im Fibrinogen durch die trypsinähnliche Spezifität des Thrombins definierte Peptidbindungen gespalten und monomeres Fibrin und niedermolekulare Bruchstücke gebildet (42). Den Aktivatoren der Kaskade steht eine Reihe von natürlichen Thrombininhibitoren des Serums (Antithrombine) gegenüber. Diese steuern das Gerinnungssystem physiologischerweise und verhindern so eine fortschreitende Thrombosierung. Neben dem α_2 -Makroglobulin und dem Antithrombin III, die als Thrombininaktivatoren wirken, sei hier noch der in Rinderorganen vorkommende polyvalente Proteaseninhibitor (Kunitzinhibitor) (3), erwähnt, der klinisch unter dem Namen Trasylol Bedeutung erlangte. Neben seiner Wirkung gegen Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein, Plasmin, Pronase und Papain konnte nachgewiesen werden (43), dass er eine starke Hemmwirkung gegenüber dem Antihämophiliefaktor besitzt und die Entstehung aktiver Gewebsthrombokinase aus Plasmin und Thrombozytenfaktoren hemmt, jedoch nicht bereits aktive Thrombokinase.

Analog den Vorgängen bei der Bildung des Blutgerinnsels ist die Auflösung des Thrombins wieder die Folge der Einwirkung einiger proteolytischer Enzyme. Plasmin als hieran beteiligtes Enzym existiert nicht in aktiver Form im Blut, sondern wird aus einer inaktiven Vorstufe freigesetzt. Die Aktivierungsvorgänge sind noch nicht endgültig aufgeklärt. Sie beruhen wahrscheinlich auf limitierten proteolytischen Vorgängen. Plasmin ist ein proteolytisches Enzym, dessen Spezifität der des Trypsins ähnlich ist. Infolge dieser Substratspezifität wurde zunächst angenommen, dass alle Trypsininhibitoren Hemmwirkung gegen Plasmin haben. Es zeigte sich jedoch, dass neben Trypsin-Plasmin-Inhibitoren auch strengspezifische Trypsininhibitoren vorkommen. Stark inhibiert wird Plasmin durch polyvalente Inhibitoren, die neben Trypsin auch Chymotrypsin und Kallikrein hemmen. Man findet aber auch bei spezifischen Trypsininhibitoren, die gegen Plasmin unwirksam sind, eine starke Hemmung bei der thrombelastographischen Untersuchung der Fibrinolyse. Es lässt sich eine doppelte Wirkung von Proteaseninhibitoren auf das fibrinolytische System ableiten: 1. die Hemmung die-

ses Vorgangs aus der Endstufe der Plasmininaktivierung durch Inhibierung der Plasminwirkung selbst und 2. die Inaktivierung der proteolytischen Vorgänge bei der Plasminaktivierung.

Pharmakologie der Proteasen- inhibitoren.

Von den bisher isolierten Inhibitoren wurde vor allem der unspezifische Trypsininhibitor (Kunitz-Inhibitor) auf seine pharmakologischen Eigenschaften untersucht, da er sich auf Grund seines Hemmverhaltens im Gegensatz zu den spezifischen Inhibitoren zur Therapie zahlreicher Erkrankungen eignet.

Die Applizierung in Form des Präparates Trasylol erfolgt am besten in einer Dauertropfinfusion, um über längere Zeit einen konstanten Spiegel in Serum und Interstitium zu erreichen. Die Verträglichkeit ist gut. Die LD₅₀ liegt bei Mäusen bei $2,5 \cdot 10^6$ KIE/kg KG (28). Beim Menschen kommt eine Sensibilisierung äusserst selten vor. Die Untersuchung von Speicherung und Abbau ergab: (28)

Die Serumhalbwertszeit beträgt ca 15 Min. Nach 2 Stunden liegen 80 % des Inhibitors in aktiver Form in der Niere vor. Erst nach 6 Tagen ist die Niere wieder völlig inhibitorfrei. Insgesamt wurden im Harn aber nur 10 % des Inhibitors in aktiver Form vorgefunden. Das bedeutet, dass der grösste Teil in der Niere inaktiviert und abgebaut wird. Die wichtigste pharmakologische Wirkung dieses Inhibitors sind (28) :

1. Hemmung der Kininogenasen und damit der Freisetzung von Kinin in Pankreas und Serum, Hemmung von Plasmin und seinen Vorstufen, von Trypsin, Chymotrypsin und Kalikrein (44).

2. Erhöhung der Gefässpermeabilität

3. ein antithromboplastischer Effekt bei hohen Dosen.

Daraus ergeben sich folgende Indikationen für die Anwendung von Trasylol:

1. Entzündungen, vor allem die akute Pankreatitis

2. Schock

3. primäre und sekundäre Hyperfibrino- und Hyperfibrinogenolysen.

III. Experimenteller Teil

Das Vorkommen von niedermolekularen Proteaseninhibitoren in oben genannten Organen, besonders in den Drüsen des Verdauungstraktes und im Sekret der Schleimhäute des Respirationstraktes, führte zu der Vermutung, dass auch in den Schleimhäuten des Intestinaltraktes des Menschen und der Säugetiere niedermolekulare Inhibitoren vorhanden sind. Meine Aufgabe war es nun, den Intestinaltrakt von Hund und Mensch nach säurestabilen Proteinaseinhibitoren zu untersuchen und diese zu charakterisieren. An menschlichem Material standen mir nur Operationspräparate von Colonresektionen zur Verfügung. Beim Hund wurden Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon getrennt untersucht.

Ergebnisse

Inhibitorgehalt bezogen auf Frischgewicht:

Die Isolierung der Mukosa in grösseren Mengen ist problematisch. Daher wurde für die quantitative Bestimmung das gesamte Darmgewebe verwendet. Die Hemmstoffgehalte sind deshalb sehr niedrig. Der Inhibitorgehalt wurde bestimmt nach Homogenisierung mit Perchlorsäure und Neutralisierung mit KOH (4 molar) und Entfernung der verbliebe-

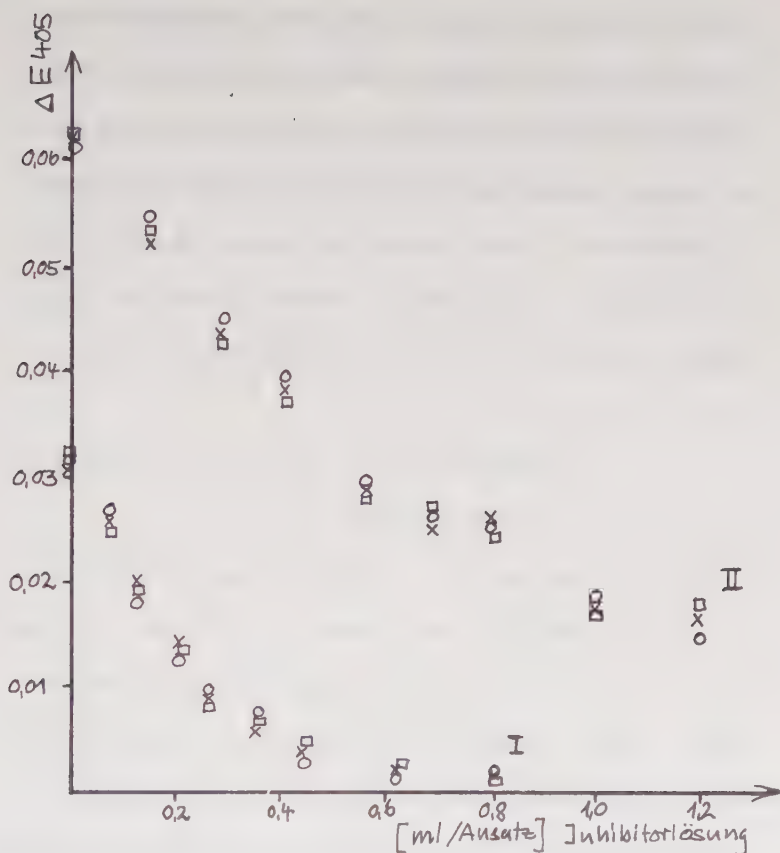
nen Trübung durch Einfrieren und Wiederauftauen.

Tabelle 1 zeigt den Inhibitorgehalt in den verschiedenen Darmregionen (Tunica et mucosa).

Species	Darmregion	Inhibitorgehalt (ImU/g)
Mensch	Colon	5.5
Hund	Duodenum	7.0
Hund	Jejunum	3.8
Hund	Ileum	2.0
Hund	Colon	7.4

Hemmspektrum der verschiedenen Inhibitor- konzentrate des Hundes.

Gegen Trypsin und Chymotrypsin ergeben die Inhibitoren aus den verschiedenen Darmabschnitten völlig identische Hemmkurven. Die Hemmung von Chymotrypsin ist wesentlich schwächer als beim menschlichen Inhibitor. Eine Beziehung auf molarer Basis zwischen beiden Hemmwirkungen kann nicht hergestellt werden. Es wäre hier auch denkbar,



Hemmwirkung von angereichertem Inhibitor aus dem Intestinaltrakt des Hundes gegen Trypsin (Kurve I) und Chymotrypsin (Kurve 2). X Duodenum □ Ileum ○ Colon
 Trypsin: im Ansatz 10 mU Trypsin, Inhibitorlösung, Tri-äthanolamin-HCl-Puffer 0,2 mol/l pH 7.8 bis Endvolumen 2 ml. 1 ml Substratlösung, Endkonzentration 73 $\mu\text{mol/l}$, dE_{405}/min der ungehemmten Reaktion 0,033.

Chymotrypsin: im Ansatz 20 mU Chymotrypsin, Inhibitorlösung, Puffer wie bei Trypsin, Substrat 1 ml, Endkonzentration 0,43 mmol/l, $dE_{405}/30 \text{ min}$ der ungehemmten Reaktion 0,065.

dass zwei verschiedene Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen vorliegen. Die konstante Relation der Hemmwirkung gegen beide Enzyme durch Präparate aus verschiedenen Darmabschnitten spricht jedoch gegen diese Interpretation. Eine Hemmung von Plasmin konnte mit diesen Präparaten nicht erreicht werden. Ebenso war keine Hemmung der menschlichen Leukozytenproteasen feststellbar.

Hemmspektrum und Hemmkurven des Inhibitors aus menschlichem Colon.

Das Inhibitorkonzentrat aus menschlichem Material vermag Trypsin, Chymotrypsin und Leukozytenproteasen zu hemmen. Dass die Hemmung nicht durch unspezifische Effekte zustande kommt, zeigen die entsprechenden Hemmkurven. Es ist die durch steigende Mengen Inhibitorkonzentrat erzielbare Hemmung definierter Enzymmengen graphisch dargestellt. Die Trypsinhemmung ist bis zu einem Hemmgrad von 50 % direkt der Inhibitormenge proportional. Bei höheren Konzentrationen macht sich die Dissoziation der Enzym-inhibitorkomplexe bemerkbar. 50 %ige Hemmung ist durch etwa 5 ImU erreichbar, bei 10 mU eingesetztem Trypsin.

Bei 20 mU eingesetztem Chymotrypsin wird die 50 %ige Hemmung durch 10 ImU erreicht. Daraus kann abgeleitet werden, dass der Inhibitor jeweils 1 Molekül Trypsin oder Chymotrypsin zu inhibieren vermag.

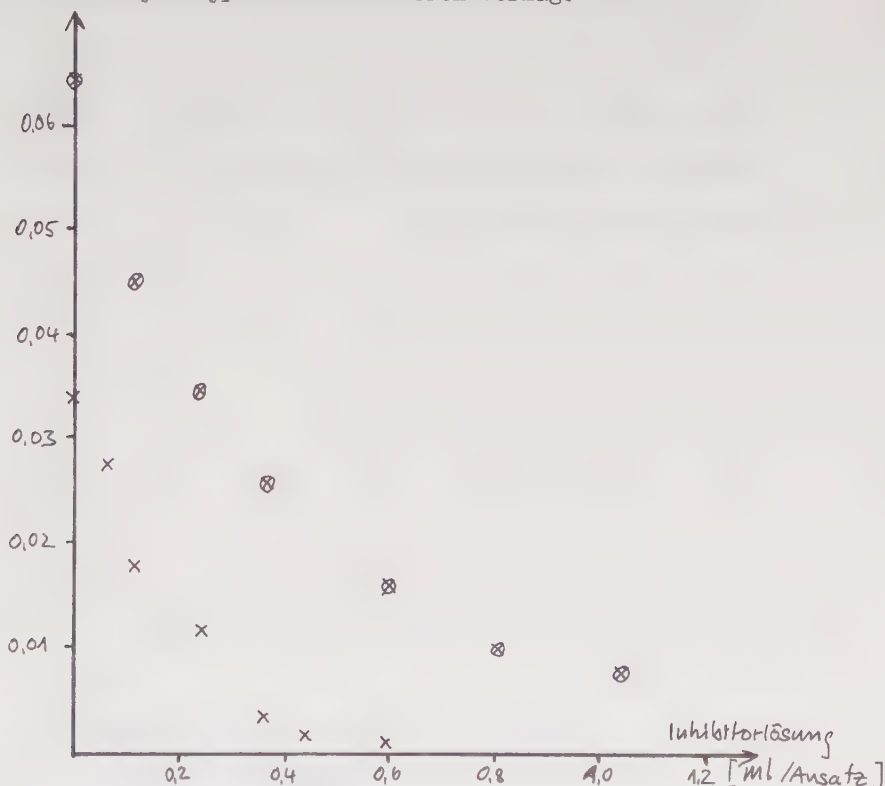
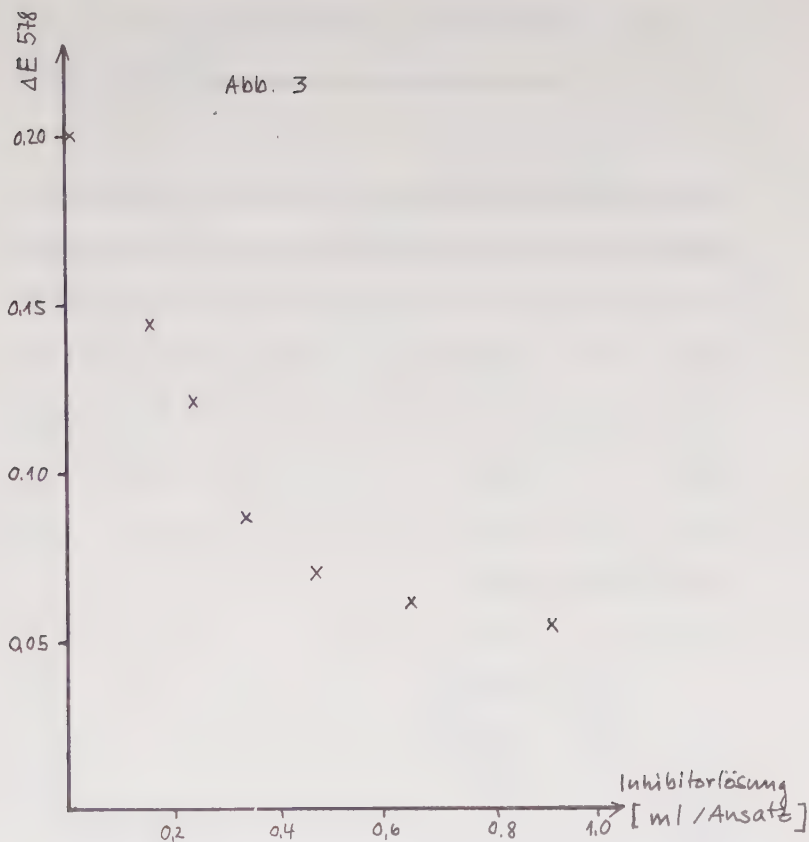


Abb. 2 Hemmwirkung von angereichertem Inhibitor aus menschlichem Colon gegen Trypsin (X - X) und Chymotrypsin (⊗ - ⊗)
Konstante Enzymmengen, steigende Inhibitorkonzentration pro Ansatz
Bedingungen wie Abb.1

Die Proteasen des Cytosols von Leukozyten stellen ein komplexes Gemisch verschiedener Proteasen dar.

Die Hauptaktivität entfällt auf "alkalische" Proteasen, die durch den niedermolekularen Inhibitor der oberen Luftwege (46) und durch α_1 -Antitrypsin des Blutserums (47) hemmbar sind. Die nur partielle Hemmung der Proteasen des Cytosols wird durch die Anwesenheit nicht hemmbarer Proteasen bewirkt.

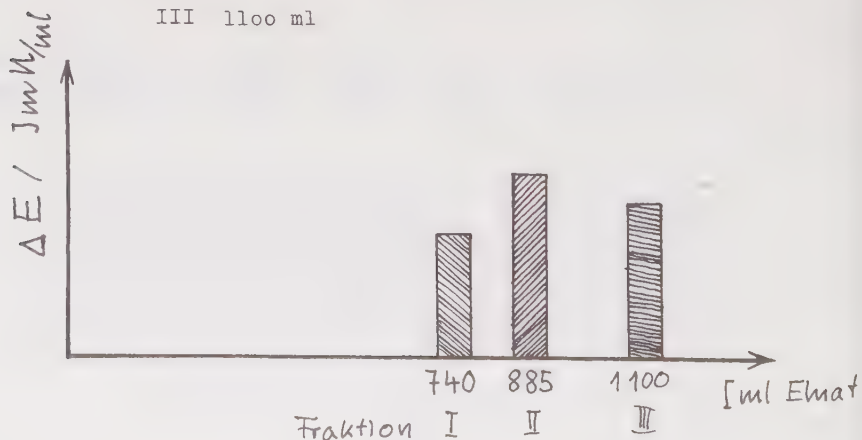


Hemmwirkung von angereichertem Inhibitor aus menschlichem Colon gegen Leukozytenproteasen
 Konstante Enzymmenge (300 ug), steigende Inhibitor-
 menge im Ansatz
 Ordinate ΔE_{578} nach Umsetzen aliquoter Teile
 mit Folinreagenz. ΔE_{578} der ungehemmten Reak-
 tion 0,20

Bestimmung des Molekulargewichts
des Inhibitors aus menschlichem
Colon.

Nach Reinigung des Inhibitorkonzentrates mit Adsorptionschromatographie an DEAE-Cellulose und Entsalzung und Einengung mit Druckdialyse konnte das Molekulargewicht mittels Gelbfiltration bestimmt werden. Wir verwendeten Sephadex G 75. Masse der Chromatographiesäule waren 220 cm Länge und 3,4 cm Durchmesser. Die Auftrennung im Molekularsieb ergab Aktivitätsmaxima bei folgenden Elutionsvolumina:

Fraktion I	740 ml
II	885 ml
III	1100 ml

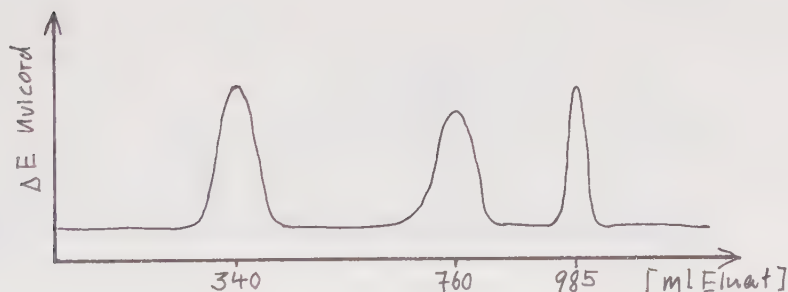


Zur Bestimmung des Molekulargewichts verwendeten wir nun folgende Testsubstanzen: Dextranblau zur Bestimmung des Innenvolumens der Säule mit Molekulargewicht 2 Mill. und als Eichsubstanzen Chymotrypsinogen und Cytochrom C mit Molekulargewicht 24 000 und 13 000. Das ergab folgende Elutionsvolumina:

Dextranblau $V_0 = 370$ ml

Chymotrypsinogen $V_1 = 760$ ml

Cytochrom C $V_2 = 985$ ml



Daraus lässt sich nun die Eichkurve erstellen auf welcher die Quotienten $V_{\text{Eichsubstanz}}/V_{\text{Innenvolumen}}$ in Abhängigkeit zum Molekulargewicht aufgetragen werden. Die unbekann-

ten Molekulargewichte können nun in Abhängigkeit zu ihrem Elutionsvolumen V_x bzw. dem Quotienten V_x/V_{Innen} volumen abgelesen werden.

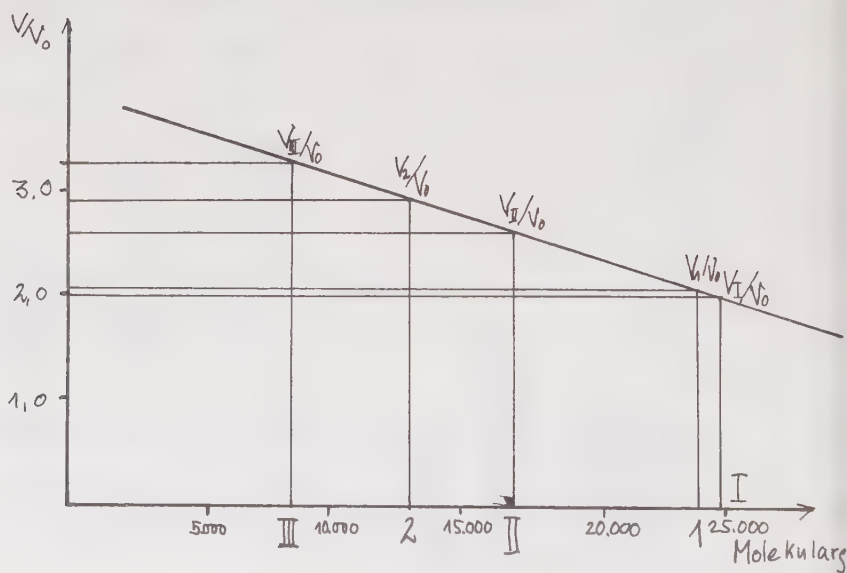
$$V_1/V_0 = 2,06$$

$$V_2/V_0 = 2,90$$

$$V_I/V_0 = 2,0$$

$$V_{II}/V_0 = 2,6$$

$$V_{III}/V_0 = 3,25$$



Für die Inhibitorfraktionen ergibt sich folgendes Molekulargewicht:

I = 24 800

II = 17 000

III = 8 500

IV. Methoden

Gewinnung eines Extraktes niedermolekularer Proteine:
Die Darmabschnitte wurden durch Spülen mit physiologischer NaCl-Lösung gereinigt und sofort in Perchlorsäure (40 %) homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert und der Überstand unter Kühlung mit konzentrierter KOH neutralisiert bis zu pH 6.0 (27). Das ausgefällte Kaliumperchlorat wird erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird nun im Vakuum eingeengt. Dabei werden stark opalisierende Lösungen erhalten, mit denen optische Hemmtests nicht möglich sind. Durch Einfrieren und Wiederauftauen war es möglich, die Trübungsstoffe zur Aggregation zu bringen und abzuzentrifugieren. Zur Entsalzung verwendeten wir die Chromatographie auf Biogel P 2-Säulen mit Ammoniumacetat 0,1 molar. Zur Aufbewahrung oder zum Zwecke starker Einengung kann die entsalzte Inhibitorlösung mit geringem Verlust gefriergetrocknet werden. Zur weiteren Reinigung diente die Adsorptionschromatographie an DEAE-Cellulose mit konkavem NaCl-Gradienten. Zur erneuten Entsalzung und gleichzeitigen Konzentrationserhöhung bis auf das 10-fache wurde die

Druckdialyse angewendet. Wir verwendeten die Membran
Amicon UM 2.

Bestimmung der Inhibitor-einheiten durch Trypsintest:

Die Definition der internationalen Inhibitoreinheit
wird abgeleitet von der "internationalen Enzymeinheit".

Nach dem "Report of Enzyme Commission" ist eine Enzymeinheit diejenige Menge eines Enzymes, die unter genormten Bedingungen ein μ -Mol Substrat in einer Minute bei 25 Grad Celsius umsetzt. Nach Trautschold wird eine Enzymeinheit durch eine Inhibitoreinheit gehemmt. Dies trifft jedoch im Versuch nur bis zu einer bestimmten Inhibitor-konzentration zu, bis zu ca 50 %iger Hemmung. Ab da steigt die Hemmung nicht mehr proportional der eingesetzten Menge Inhibitorsubstrat an, da ab da die Dissoziation des Enzym-inhibitor-komplexes eintritt und ein chemisches Gleichgewicht vorliegt.

Trypsin-hemmtest:

Trypsin wird von nahezu allen bisher bekannten Proteasen-inhibitoren gehemmt und ist daher zur Bestimmung der vorhandenen Inhibitor-menge besonders geeignet.

Prinzip:

Trypsin katalysiert die hydrolytische Spaltung des synthetischen Substrats N-Benzoyl-dL-Arginin-p-Nitroanilid. Durch die Farbstoffeigenschaft des freigewordenen p-Nitroanilid wird die enzymatische Aktivität messbar. Das Substrat ist im Überschuss vorhanden, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Extinktionsänderung ist nur abhängig von der enzymatischen Aktivität. Bei Zugabe von inhibitorisch aktiver Lösung ist die Extinktionsänderung entsprechend geringer. Der Test wird bei 25 Grad Celsius und konstanten pH 7,8 durchgeführt. Die Reagenzien für den Test werden in folgenden Konzentrationen hergestellt:

15 mg Trypsin in 100 ml 10^{-3} normaler HCl.

100 mg N-Benzoyl-dL-Arginin-p-Nitroanilid in 100 mg Aqua bidest.

1,2 Triäthanolaminpuffer (Tra) pH 7,8 + Calcium $^{++}$.

Inhibitorlösung verschiedener Herkunft und Konzentration. Zur Messung der Extinktion verwendeten wir ein Eppendorff-Photometer. Das Absorptionsmaximum von p-Nitroanilin liegt bei 405 nm. Die Reaktion findet in Glasküvetten mit Volumen 3 ml und Schichtdicke 1 cm statt.

Ansatz zur Bestimmung des Leerwertes.

0,2 ml Trypsinlösung (= 10 U)

1,8 ml Tr-Puffer.

Inkubation 1 Min.

Zugabe von 1 ml N-Benzoyl-dL-Arginin-p-Nitroanilid-Lösung

Messung der Extinktionsänderung ΔE jede Minute über mindestens 3 Minuten.

Ansatz zur Testung des Inhibitors mit verschiedenen Konzentrationen

1,2 ml Trypsinlösung

0,1 - 1,8 ml Inhibitorlösung

Tra-Puffer 1,8 ml - Menge Inhibitorlösung

Inkubation 1 Min.

1 ml N-Benzoyl-dL-Arginin-p-Nitroanilid.

Bei reinen Trypsinpräparaten entspricht 1 mU Enzymprotein einer mU Enzym. Einer mU Trypsin entspricht eine Extinktionsänderung $\Delta E = 0,00332/\text{min}$.

Ist der zu testende Inhibitor in Boratpuffer gelöst, muss der Leerwert ebenfalls mit der entsprechenden Menge Boratpuffer bestimmt werden, da Borat eine Trypsinhemmung bewirkt.

Chymotrypsinhemmtest:

Chymotrypsin spaltet hydrolytisch das synthetische Substrat Succinyl-Phenylalanin-p-Nitroanilid (SUPHEPA). Dabei wird als Farbstoff p-Nitroanilin frei. Das Absorptionsmaximum liegt bei 405 nm. Gemessen wird in 3 ml Testküvette mit Schichtdicke 1 cm. Dabei wird folgender Ansatz verwendet:

Leerwert zur Ermittlung der Autolyse des Substrats:

2 ml Triäthanolaminpuffer

1 ml SUPHEPA

Leerwert zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der nicht gehemmten Reaktion:

0,05 - 0,4 ml (5 - 40 µg) Chymotrypsinlösung

2 ml - Chymotrypsinlösung Tra-Puffer

nach 1 Min. Inkubation

Zugabe von 1 ml SUPHEPA

Testansatz mit Inhibitor:

a (0,05 - 0,4) ml Chymotrypsinlösung

b ml Inhibitorlösung

2 ml - a - b Tra-Puffer

Inkubation 1 Min.

Start der Reaktion mit 1 ml SUPHEPA.

Die Extinktionszunahme wird nach 30 Minuten festgestellt. Bei reinem Chymotrypsinpräparat entspricht ein µg Enzymprotein einer mU Enzym. Eine mU Chymotrypsin entspricht einer Extinktionsänderung $\Delta E = 0,0032/\text{min}$.

Plasminhemmtest:

Plasmin katalysiert auch die Hydrolyse von N-Benzoyl-dL-Arginin-p-Nitroanilid. Photometrisch bestimmbares Reaktionsprodukt ist auch hier p-Nitroanilin. Es wurden dem Trypsintest analoge Ansätze verwendet.

Herstellung der Enzymlösung:

Es werden 2,5 mg Novo-Plasmin in 2 ml Aqua bidest gelöst. Gepuffert wird der Ansatz mit 0,2 molarem Tri-Äthanolaminpuffer pH 7,8.

Ansatz:

0,2 ml Plasminlösung

0,05 ml - 0,5 ml Inhibitorlösung

Tra-Puffer ad 2 ml

Inkubation 10 Minuten bei 25 Grad Celsius

Start der Reaktion mit 1 ml N-Benzoyl-dL-Arginin-p-Nitroanilid

Ablesen der Extinktion sofort und 2mal nach 10 Min

Aktivitätsberechnung erfolgt analog der bei Trypsin.

Hemmung von Leukozytenproteasen:

“Zur Prüfung der Hemmwirkung wurde die Verminderung der Spaltung von Hämoglobin durch Leukozytenproteasen untersucht. Als Enzym wurden im Labor dargestellte Leukozytenproteasen verwendet. Die Leukozyten stammen aus Eiter von Abszesspunktionen und Nasennebenhöhlenspülungen. Die einzusetzende Menge ist abhängig von der Qualität des Präparates. Substrat war mit Harnstoff denaturiertes Hämoglobin.

Wir verwendeten folgende Ansätze:

Enzym (300 mg)

+ Inhibitor + Puffer (Borat 50 mmol/l, pH 7,5) mit einem Gesamtvolumen von 0,5 ml werden 10 Minuten vorinkubiert. Dann werden 2,5 ml Hämoglobinlösung zugegeben und 2 Stunden bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die Reaktion wurde mit 5 ml Trichloressigsäure (Konzentration 50 g/l) gestoppt und nicht hydrolysierte Proteine durch Zentrifugieren entfernt. 2,5 ml des Überstandes wurden mit 5 ml Na OH (Konzentration 0,5 mol/l) neutralisiert. Mit 1,5 ml Folinreagenz wurden die Reaktionsprodukte gefärbt. Nach erneutem Zentrifugieren wird bei 578 nm die Extinktion gemessen.

sen. Beim verwendeten Proteasenpräparat ergibt die ungehemmte Reaktion gegenüber dem Reagenzienleerwert eine Extinktionszunahme von 0,20. Bei ungereinigten Inhibitorpräparaten ist es notwendig, einen zusätzlichen Leerwert zu bestimmen, der nur Inhibitorlösung und Substrat enthält. Denn die Inhibitorpräparate können geringe Mengen unspezifischer nicht hemmbarer Proteasen enthalten. Diese Ansätze werden genauso lang inkubiert wie die Hemmansätze. Die von den Leukozytenproteasen ausgehende Aktivität, bzw. die in Gegenwart verschiedener Inhibitormengen verbleibende Restaktivität entspricht der Extinktionsdifferenz der Parallelansätze.

Auftrennung und Isolierung der gesuchten
antiproteolytischen Aktivität nach Molekülgrösse (Gelfiltration).

Wir verwendeten Sephadex G 75. Masse der Säule waren 220 cm Länge und 3,4 cm Durchmesser. Als Elutionspuffer diente 0,05 molarer Boratpuffer mit pH 7,8. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca 5 ml aufgefangen und mit dem Trypsintest auf seinen Inhibitorgehalt untersucht. Das Elutionsvolumen einer Substanz ist abhängig von ihrem Molekulargewicht. Kleine Moleküle werden langsamer eluiert

da ihnen mehr Raum zur freien Diffusion zur Verfügung steht. Durch Erstellen einer Eichkurve ist es möglich, unbekanntes Molekulargewicht anhand des Erscheinens der Substanz im Eluat zu bestimmen. Dazu wird das Innenvolumen der Säule bestimmt. Dies geschieht durch Auftragen einer sehr hochmolekularen Substanz, die im Molekularsieb nicht zurückgehalten wird. In diesem Fall Dextranblau (2 Mill.). Das Erscheinen der Substanz im Eluat entspricht dem Innenvolumen der Säule. Die Elutionsvolumina zweier Substanzen mit bekanntem Molekulargewicht, die im Bereich der Auftrennmöglichkeit der Säule liegen, werden bestimmt. Wir verwendeten Chymotrypsinogen (24 000) und Cytochrom C (13 000). Zur Auswertung wird eine Eichkurve erstellt. Auf die y-Achse wird der Quotient von Elutionsvolumen zu Innenvolumen aufgetragen, auf der x-Achse das Molekulargewicht. Das Molekulargewicht unbekannter Substanzen ist in Abhängigkeit zu ihren Elutionsvolumen V_x bzw. dem Quotienten V_x / V_0 abzulesen.

V. Diskussion

Die in den einzelnen Darmabschnitten des Menschen gefundenen Inhibitoren zeigen eine ähnliche immunologische Kreuzreaktion mit dem Inter- α -Trypsininhibitor, wie sie von Hochstrasser und Mitarbeiter für säurestabile Inhibitoren im Harn, Serum und Bronchialsekret nachgewiesen werden konnte. Dem Autor gelang der Nachweis, dass diese Inhibitoren physiologischerweise durch die Wirkung von Kallikrein aus dem hochmolekularen humoralen Inter- - Trypsininhibitor des Serums durch limitierte Proteolyse freigesetzt werden. Dieser Vorgang kann in vitro durch Inkubation von Inter- -Inhibitor mit Trypsin simuliert werden, wobei jedoch ein Inhibitor mit niedrigerem Molekulargewicht gebildet wird. Die physiologischen Inhibitoren können durch das gleiche Vorgehen zu diesen Inhibitoren abgebaut werden. Durch Langzeitbehandlung dieses Inhibitors mit Trypsin kann eine weitere Verminderung des Molekulargewichts dieses artifiziellen Inhibitors erreicht werden.

Die Autoren schliessen aus diesen Befunden (48, 49), dass der Inter- -Trypsininhibitor als Proinhibitor für eine

Reihe von säurestabilen Inhibitoren anzusehen ist.

Im Rahmen dieser neuen Erkenntnisse können meine Ergebnisse folgendermassen interpretiert werden. Durch Einwirkung von Kallikrein, das in der Darmschleimhaut vorkommt, entsteht der Inhibitor mit dem höchsten Molekulargewicht als physiologisches Inter- -Inhibitor Produkt. Durch das im Darm vorhandene Trypsin erfolgt jedoch der weitere Abbau und es werden deshalb zusätzlich 2 weitere Inhibitoren gefunden, deren Molekulargewicht angenähert dem Molekulargewicht der Inhibitoren entsprechen, die von Hochstrasser und Mitarbeiter durch Inkubation von Inter- -Trypsininhibitor bzw. physiologischem säurestabilem Serum-inhibitor mit Trypsin erhalten werden.

Zusammenfassung

In allen Darmabschnitten des Hundes wurde inhibitorische Aktivität vorgefunden. Auf Grund des Aufarbeitungsverfahrens handelt es sich um einen niedermolekularen Inhibitor. Er hemmt Trypsin und Chymotrypsin. Gegen Plasmin und Leukozytenproteasen konnte keine Hemmung nachgewiesen werden. Bei der zur weiteren Charakterisierung notwendigen Isolierung stösst man auf Schwierigkeiten. Der Inhibitor ist nicht säurestabil. Im menschlichem Colon wurde inhibitorische Aktivität gegen Trypsin, Chymotrypsin und Proteasen aus dem Cytosol von Leukozyten gefunden. Hemmung gegen Plasmin konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts werden 3 Komponenten festgestellt:

I 24 800, II 17 000, III 8 500.

Hierbei handelt es sich wohl um Spaltprodukte des Inter- α -trypsininhibitors, die auch in vitro durch Inkubation mit Kallikrein und Trypsin erhalten werden.

Literatur:

1. Weinland E., Z.Biol.44, 1 (1903)
2. Kraut H., E.K.Frey, E.Werle, Z.Physiol.Chemie 192, 1 (1930)
3. Kunitz M., J.H.Northrop, J.gen.Physiol. 19, 991 (1936)
4. Kazal, L.A., D.S.Spicer, R.H.Braninsky, J.Amer.chem. Soc. 70, 3034 (1948)
5. Werle, El, L.Maier, F.Löffler: Biochem.Z. 321 (1951) 372
6. Ham W.E., R.M.Sandstedt, J.biol.Chem. 154 505 (1944)
7. Belolhwak L.: Ber.Getreidechemiker-Tagung, Detmold 1964 S.19
8. Shyamala G., B.M.Kennedy, R.L.Lyman: Nature 192 (1961)360
9. Shyamala G., R.L.Lyman: Canad.J.Biochem., 42 (1964) 1825
10. Laskowski M.,: In: S.P.Colowick, M.O.Kaplan, Methods of Enzymology, II, 1955, 36
11. Collier H.B., : Canad. J.Res. 19B (1941), 90
12. Green, N.M.: Biochem.J., 66 (1957), 416
13. Peanasky R.J., M.Laskowski: Biochem.biophys.Acta, 37 (1960), 167
14. Peanasky R.J.: Fed.Proc.22 (1963) 246
15. Werle E.L., L.Maier, E.Ringelmann: Naturwissenschaften, 39 (1952) 328
16. Laskowski M., M.Laskowski jr.: In: M.L.Anson, K.Bailey, J.T.Edsall, Advances in Protein Chemistry IX (1954)203
17. Green N.M., H.Neurath: In: H.Neurath, K.Bailey, The Proteins, N.Y. IIB (1954), 1160
18. Desnuelle P.,: In: P.D.Boyer, H.Lardy, K.Myrbäck, The Enzymes, Bd.IV, (1960) S.128

19. Laskowski M.jr., M.Laskowski: J.biol.Chem. 190 (1951) 563
20. Webster M.E., I.V.Pierce: J.Pharmacol.exp.Ther., 130 (1960) 486
21. Sale E.F., S.G.Priest, H.Jensen: J.biol.Chem., 227 (1957), 83
22. Wu F.C., M.Laskowski: J.biol.Chem., 235 (1960), 1680
23. Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem., Bd. 354 S.927-932, Aug.1973
24. Dissertation Dr.W.Sauer
25. Reichert, Hochstrasser, Bioch.u.Physiol. im Respirationstrakt, Archiv exp.Ohren-Nasen-und Kehlkopfheilkd., Bd. 202, Heft 2 (1972)
26. Hoppe, Seyler's Z.Physiol.Chem., Bd.354 S.923-926, Aug.1973
27. Z.Klin.Chem.Biochem. 10.Jg. (1972) S.450-452
28. Fritz H., Habilitationsarbeit Med.Fak.München 1968
29. E.Shaw, Methods in Enzymology 19, 677, 1967
30. Haendle H.,: Dissertation Med.Fak.Univ.München 1966
31. Haendle H., H.Fritz, I.Trautschold, E.Werle: Z.physiol.Chem. 343 (1965), 185
32. F.Fiedler, E.Werle, Z.Physiol.Chem. 349, 942 (1968)
33. Gladner, Laki I.Amer.Chem.Soc. 80, 1263 (1958)
34. H.Fritz, E.Fink, M.Gebhardt, Z.Physiol.Chem., 350, 933 (1969)
K.Hochstrasser, E.Werle
35. J.H.Northrop, M.Kunitz, Science 73, 262 (1931)
36. M.Kunitz, I.gen.Physiol. 21, 601 (1938)

37. M.Kunitz, J.H.Northrop, I.gen.Physiol. 18, 433 (1935)
38. M.Kunitz, I.gen.Physiol. 22, 207 (1938)
39. R 12 H.Fritz, Trautschold, E.Werle, Meth.d.enz.Analyse Verlag Chemie
40. R 13 E.Werle, Trautschold, H.Haendle, H.Fritz, Annual of the NY Acad. of Science 146, 464 (1968)
41. R 14 M.Rocha e Silva, Nature 145, 591 (1940)
M.Schachter, Biochem.Pharmak. 10, 87, (1962)
A.Herxheimer, M.Schachter, Nature 145, 591 (1940)
K.D.Bhoola, I.D.Calle, M.Schachter, I.Physiol. 152, 75 (1960)
42. R 15 Atlas of Protein Sequence and Structure (1966)
43. R 17 R.Marx, P.Clemente, E.Werle, E.Appel, Blut 5, 367 (1969)
44. R.Marx, M.M.-Wochenschrift 108, 1267 (1966)
45. Gross R., G.Kroneberg, Neue Aspekte der Trasylol-Therapie I., Schattauerverlag Stuttgart (1966)
46. Hochstrasser K., Reichert R., Werle E., Z.Klin.Chem. Klin.Biochem. 10 (1972)
47. Libermann J., Gawas M.A., (1971) J.Lab.Clin.Med.77, 713 - 727
48. Hochstrasser K., Bretzel G., Feuth H., Hiller N., u. Lempart K., z.physiol.chem. 357 153 (76)
49. Bretzel G., u. Hochstrasser K., z.physiol.chem. 357 487 (1976)

Herrn Prof. Dr. K. Hochstraßer schulde ich für die Überlassung des Themas und die Gewährung eines Arbeitsplatzes großen Dank.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche Beratung und Hilfe.

Lebenslauf

Am 13. Februar 1949 bin ich als Sohn des Dipl.Ing. Georg Bickel und seiner Ehefrau Therese, geb. Obergröbner in München geboren. Hier besuchte ich von 1955 - 1959 die Volksschule an der Südl-Auffahrtsallee. Am 3.September 1959 trat ich in das Ludwigs-Gymnasium (humanistisches Gymnasium) an der Fürstenriederstrasse über und legte dort am 12. Juni 1968 meine Reifeprüfung ab. Mein Studium der Humanmedizin begann ich am 15. Oktober 1968 an der Ludwig-Maximilians-Universität München und beendete es durch das Staatsexamen im Juni 1974. Nach meiner Medizinalassistentenzeit in München und Traunstein erlangte ich im September 1975 die Approbation. Seit 3.November 1975 leiste ich als Stabsarzt bei Luftwaffe meinen Wehrdienst.

